

**M. TRUPO, V. LAROCCA, R.A. MAGARELLI,  
M. MARTINO, A. SPAGNOLETTA,  
S. PALAZZO, G. ORIOLO, A. AMBRICO**

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali  
Divisione Biotecnologie e Agroindustria  
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi  
Centro Ricerche Trisaia

## **PROGETTO TINNOGEPPRA**

Processi tecnologici per il miglioramento dell'essiccazione  
del peperone di Senise e valorizzazione degli scarti

RT/2023/24/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,  
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

M. TRUPO, V. LAROCCA, R.A. MAGARELLI,  
M. MARTINO, A. SPAGNOLETTA,  
S. PALAZZO, G. ORIOLO, A. AMBRICO

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali  
Divisione Biotecnologie e Agroindustria  
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi  
Centro Ricerche Trisaia

## PROGETTO TINNOGEpra

Processi tecnologici per il miglioramento dell'essiccazione  
del peperone di Senise e valorizzazione degli scarti

RT/2023/24/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,  
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina [www.enea.it](http://www.enea.it)

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

## PROGETTO TINNOGEPRA

Processi tecnologici per il miglioramento dell'essiccazione del peperone di Senise e valorizzazione degli scarti

M. Trupo, V. Larocca, R.A. Magarelli, M. Martino, A. Spagnoletta, S. Palazzo, G. Oriolo, A. Ambrico

### Riassunto

I peperoni secchi di Senise rappresentano un prodotto con un grande interesse di mercato per il quale una quota crescente della produzione è orientata anche verso mercati internazionali.

Per rispondere a queste esigenze di ampliamento di mercato è necessario innovare e standardizzare il processo di essiccazione al fine di ridurre le perdite e limitare eventuali proliferazioni microbiche.

Allo scopo, nel presente studio, sono state testate due modalità di essiccazione a 40 e 45 °C con ventilazione forzata o insufflando aria deumidificata. I processi così condotti hanno accelerato notevolmente i tempi di essiccazione e dalle analisi sui prodotti così ottenuti non sono state osservate significative differenze in termini di carotenoidi totali e polifenoli totali rispetto a quelli osservati su dei peperoni essiccati in maniera tradizionale. Inoltre, è stato riscontrato un livello di acido ascorbico superiore riducendo i tempi di essiccazione.

I peperoni rossi (*Capsicum annum L.*), che vengono eliminati a causa della loro bassa qualità non idonea alla commercializzazione, sono stati utilizzati come materia prima per recuperare composti bioattivi in un approccio di bioraffineria. Sono state valutate le rese di estrazione dell'oleoresina e la composizione in carotenoidi degli estratti ottenuti mediante la tecnica dei fluidi supercritici (SFE) variando temperatura (40, 50 e 60 °C) e pressione (250, 350 e 450 bar). Dal profilo cromatografico degli estratti risulta che la capsantina rappresenta circa il 35% dei carotenoidi totali.

**Parole chiave:** *Capsicum annum L.*, Peperoni di Senise, Essiccazione, CO<sub>2</sub> supercritica, Carotenoidi, Capsantina.

### Abstract

*Dried Senise peppers are a product with great market interest for which a growing share of production is also oriented towards international markets.*

*To respond to these expansion needs it is necessary to innovate and standardize the drying process to reduce losses and cut down any microbial proliferation.*

*For this purpose, in the present study, two drying methods were tested at 40 and 45 °C with forced ventilation or by blowing dehumidified air.*

*The processes conducted in this way significantly accelerated the drying times and from the analyses on the products thus obtained, no significant differences were observed in terms of total carotenoids and total polyphenols compared to those observed on peppers dried in the traditional way. Furthermore, a higher level of ascorbic acid was found by reducing drying times.*

*Red peppers (*Capsicum annum L.*), destined to be discarded due to their low quality not suitable for commercialization, have been used as a feedstock to recover bioactive compounds in a biorefinery approach. The oleoresin extraction yields and the carotenoid composition of the extracts obtained using the supercritical fluids (SFE) technique were evaluated by varying temperature (40, 50 and 60 °C) and pressure (250, 350 and 450 bar). From the chromatographic profile of the extracts, it appears that capsanthin represents approximately 35% of the total carotenoids.*

**Keywords:** *Capsicum annum L.*, Senise peppers, Drying, Supercritical CO<sub>2</sub>, Carotenoids, Capsanthin.



## Indice

<b>1</b>	<b>Sintesi del progetto TinnoGePra</b> .....	5
<b>2</b>	<b>Introduzione</b> .....	6
<b>3</b>	<b>Valutazione dell'efficacia di essiccazione del peperone di Senise mediante armadi a ventilazione forzata con e senza flussaggio di aria secca.</b> .....	10
<b>3.1</b>	<b>Materiali e Metodi</b> .....	12
3.1.1	Processo di essiccazione e parametri operativi .....	12
3.1.2	Estrazione e quantificazione dei carotenoidi totali.....	13
3.1.3	Estrazione e dosaggio del contenuto di acido ascorbico e dei fenoli totali .....	14
<b>3.2</b>	<b>Risultati</b> .....	15
3.2.1	Riduzione in peso e valutazione del contenuto di carotenoidi totali, di acido ascorbico e dei fenoli totali .....	15
<b>4</b>	<b>Valutazione dell'impiego della tecnica estrattiva mediante CO<sub>2</sub> supercritica per il recupero di carotenoidi da peperoni non idonei alla commercializzazione.</b> .....	19
<b>4.1</b>	<b>Cenni sulla tecnologia estrattiva mediante CO<sub>2</sub> supercritica e descrizione dell'impianto</b> .....	20
<b>4.2</b>	<b>Materiali e metodi</b> .....	23
4.2.1	Condizioni operative dell'estrazione di carotenoidi da peperoni della cultivar Senise con CO <sub>2</sub> supercritica .....	23
4.2.2	Determinazione del profilo dei carotenoidi presenti negli estratti mediante HPLC .....	25
<b>4.3</b>	<b>Risultati</b> .....	27
4.3.1	Estrazione mediante CO <sub>2</sub> supercritica: resa di estrazione e contenuto di carotenoidi nell'estratto.....	27
4.3.2	Analisi cromatografica mediante HPLC del profilo dei carotenoidi presenti negli estratti di peperone. ....	30
<b>5</b>	<b>Discussione</b> .....	32
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b> .....	34
	<b>Bibliografia</b> .....	35



## **1 Sintesi del progetto TinnoGePra**

Il settore ortofrutticolo nazionale ed in particolare quello lucano ha l'esigenza di implementare i sistemi produttivi con innovazioni tecnologiche ecosostenibili al fine di migliorare l'efficienza del processo produttivo, contenere i prezzi al consumo e restare competitivi sul mercato mantenendo, al contempo, elevati standard qualitativi dei prodotti. In questo contesto, il progetto Trasferimento tecnologico di Innovazioni Gestionali delle Pratiche agricole negli ecosistemi ortofrutticoli (TinnoGePra), finanziato nell'ambito delle sottomisura 16.1 del PSR Basilicata 2014-2020, ha avuto l'obiettivo di contribuire al trasferimento di innovazioni, già ampiamente sperimentate, in grado di aumentare la competitività del comparto, ottimizzando i costi (sia economici sia ambientali) ed aumentando la qualità delle produzioni agricole.

In particolare, presso il Laboratorio di Bioprodotti e Bioprocessi SSPT-BIOAG del Centro Ricerche ENEA di Trisaia sono stati condotti degli studi per la valorizzazione della filiera del peperone di Senise allo scopo di migliorare le strategie di essiccazione. Inoltre, per valorizzare gli scarti delle produzioni sono stati condotti e valutati processi di estrazione di biomolecole mediante tecnica estrattiva a fluidi supercritici.



## 2 Introduzione

Il peperone (*Capsicum annuum* L.) rappresenta uno dei vegetali più importanti per il suo contenuto in sostanze fitochimiche che possono svolgere un ruolo chiave nella salute umana. Questo significa che il peperone è un valido integratore, soprattutto se essiccato, per prevenire molte malattie cardiovascolari e del sistema nervoso (Sinisgalli et al., 2020; Speranza et al., 2019). La sua principale caratteristica chimica è il notevole contenuto in acido ascorbico, carotenoidi e fenoli (Marín et al., 2004; Scopa et al., 2006).

Il peperone di Senise è una varietà locale di peperone dolce coltivato in Basilicata, che rappresenta un esempio della grande agro biodiversità italiana. Le caratteristiche organolettiche peculiari che identificano il peperone di Senise e la sua indiscussa tipicità hanno portato al riconoscimento nel 1996 dell'Indicazione Geografica Protetta (IGP) da parte della UE con la pubblicazione del regolamento (CE) n. 1263/1996 (Mipaaf, 2020). Nello stesso anno è stato costituito un Consorzio di produttori le cui attività istituzionali sono la tutela e la promozione del prodotto fresco, essiccato e della filiera che ne consegue.

Secondo il disciplinare, l'area di produzione dei "Peperoni di Senise" si estende nel territorio di dodici Comuni compresa tra la Valle del Sinni e quella dell'Agri ed è riservata a tre differenti tipi morfologici di peperoni a forma di corno, ovvero quello "appuntito", "tronco" ed "uncino". Il primo di questi è quello prevalente. Sono considerati idonei i terreni, compresi ad una quota tra i 250 ed i 340 metri, di origine alluvionale di natura limo-sabbiosi e quelli collinari di medio impasto, soggetti ad un clima tipicamente mediterraneo. La raccolta a mano del peperone inizia nella prima decade di agosto quando le bacche raggiungono il tipico colore rosso porpora.

La maggior parte della produzione del peperone di Senise è sottoposta ad essiccazione a cui si presta facilmente grazie al basso contenuto in acqua ed allo spessore sottile della bacca. Tradizionalmente, le bacche vengono disposte su teli di stoffa oppure su reti in locali asciutti e ben aerati, per almeno 2-3 giorni, lontano dalla luce. I peduncoli vengono poi infilati in serie con spago fine facendo in modo che le bacche si dispongano a spirale. Si ottengono così le cosiddette "collane" o "serte" di lunghezza compresa tra 1,5 e 2 metri (figura 1). Quest'ultime sono esposte al sole da 3 a 7 settimane e successivamente riposte in locali arieggiati.



**Figura 1. Essiccazione tradizionale del peperone di Senise mediante serte.**

Il peperone, una volta secco (figura 2a), può essere ridotto in polvere ed usato come spezia, oppure può essere fritto diventando così “crusco” ovvero “croccante” (figura 2b) per poi essere consumato come snack (figura 2c), come contorno oppure sbriciolato sulle varie pietanze.



**Figura 2. Peperoni di Senise essiccati (a), cruschi (b) e snack confezionato (c).**

I peperoni secchi di Senise sono un prodotto con un grande interesse di mercato per il quale una quota crescente della produzione è orientata anche verso mercati internazionali. (Boulter, 2017; Fanelli, 2021). Dunque, il comparto ortofrutticolo lucano è chiamato ad assumere approcci innovativi al fine di migliorare l'efficienza del processo produttivo e la sua sostenibilità tecnico/economica nonché i risultati qualitativi. Questi ultimi sono in parte conseguibili riducendo la potenziale proliferazione di funghi fitopatogeni durante il processo di essiccazione e quindi la presenza di micotossine nel prodotto finale.

Sulla base di nostre preliminari indagini conoscitive, sulle caratteristiche microbiologiche del prodotto finale del processo di essiccazione tradizionale, è emersa la presenza di frutti interessati da vistose contaminazioni fungine (figura 3). Sono stati isolati diversi funghi fitopatogeni come *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* e *Alternaria alternata*.



**Figura 3. Peperoni essiccati con evidenti proliferazioni e sporificazioni fungine.**

In particolare, *A. alternata* è un fungo molto comune capace di contaminare frutta e verdura in pre e post-raccolta anche in condizioni di bassa temperatura e stress idrico (Crudo et al., 2019; Escrivá et al., 2017). *A. alternata* produce molte micotossine e ad oggi sono state segnalate più di 70 molecole tossiche. Tra queste, le tossine più studiate sono l'alternariolo monometil etere (AME), l'alternariolo (AOH), la tentossina (TEN), l'acido tenuazonico (TeA) e l'altenuene (ALT) (Crudo et al., 2019; Panel and Chain, 2011).

La maggior parte delle tossine prodotte da *Alternaria* presenta *in vivo* genotossicità, mutagenicità, teratogenicità, citotossicità, cancerogenicità, e quindi potrebbero causare gravi effetti nocivi nell'uomo (Arcella et al. 2016). Il TeA è considerato il più tossico ad effetto acuto tra le tossine di *Alternaria*, la cui LD50 è 81-186 mg/kg di peso corporeo (Asam and Rychlik, 2013; Escrivá et al., 2017; Tralamazza et al., 2018). Da aprile 2022 la Commissione Europea stabilisce livelli guida per il monitoraggio della presenza di AOH, AME e TeA nei prodotti trasformati a base di pomodoro, paprika in polvere, semi di sesamo, semi di girasole, olio di girasole, frutta a guscio, fichi secchi e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e bambini piccoli.

La produzione di peperoni di Senise è vincolata dal disciplinare IGP (Mipaaf, 2020), che ne garantisce standard qualitativi elevati sia del prodotto fresco sia di quello essiccato. Tuttavia, considerate le attuali normative della comunità europea e le indicazioni dell'EFSA sulla

sicurezza alimentare appare evidente la necessità di individuare protocolli di essiccazione alternativi che riducano i tempi di processo senza alterare le proprietà chimiche ed organolettiche del prodotto.

Nell'ambito del Progetto TinnoGePra, presso il Laboratorio di Bioprodotti e Bioprocessi SSPT-BIOAG del Centro Ricerche ENEA di Trisaia, è stato condotto uno studio al fine di valutare come diversi parametri operativi possano migliorare ed innovare il processo di essiccazione riducendo le perdite di prodotto e preservando così alcune caratteristiche chimiche come il contenuto di acido ascorbico, carotenoidi e fenoli totali.

Inoltre, essendo il peperone di Senise una fonte importante di composti benefici per la salute il suo utilizzo in forma di estratto potrebbe rappresentare una nuova strategia in campo nutraceutico e farmaceutico (Sinisgalli et al., 2020). A tale scopo ed al fine di valorizzare gli scarti di lavorazione sono state condotte delle prove di valutazione sull'impiego della tecnica estrattiva mediante CO<sub>2</sub> supercritica per il recupero di carotenoidi da peperoni non idonei alla commercializzazione.

### **3 Valutazione dell'efficacia di essiccazione del peperone di Senise mediante armadi a ventilazione forzata con e senza flussaggio di aria secca.**

L'essiccazione è un procedimento che serve a rimuovere l'acqua presente negli alimenti senza alterarne le proprietà organolettiche. I cibi sono semplicemente disidratati e quindi le sue proprietà non sono alterate, anzi vengono protette dall'attacco dei microorganismi (Guiné, 2008; Guiné and Fernandes, 2006; Lewicki, 2006).

In altri termini si tratta di un processo con cui un liquido viene allontanato da un solido umido per evaporazione attraverso un mezzo gassoso opportuno ed è caratterizzato da due fenomeni che avvengono simultaneamente:

- il trasporto di calore, caratterizzato da un flusso termico proveniente dall'ambiente esterno e diretto verso la matrice, che provoca l'evaporazione dell'acqua, fino al raggiungimento dell'equilibrio;
- il trasporto di materia, contraddistinto da un flusso di acqua che si sposta attraverso la matrice fino allo strato superficiale dell'alimento e poi verso l'ambiente esterno (sotto forma di vapore acqueo) (Bird et al. 2006).

Il trasporto di calore può avvenire con modalità differenti:

- trasferimento diretto, investendo il solido da essiccare con aria calda o altro gas inerte avente un basso contenuto di umidità;
- trasferimento indiretto, il calore viene trasmesso al solido attraverso superfici calde;
- trasferimento per irraggiamento, il calore viene fornito per irraggiamento (ad es. microonde).

Il trasporto di materia dipende dalle caratteristiche fisiche (porosità, densità, ecc.) e chimiche (contenuto di umidità) della matrice ma anche dalle condizioni operative del processo (temperatura) (Mujumdar, 2006).

Inizialmente avviene la rimozione dell'acqua superficiale sotto forma di vapore. Quando lo strato superficiale della matrice ha perso tutta l'acqua, si genera un gradiente di concentrazione tra le cellule del primo strato e quelle degli strati successivi. Il trasporto di acqua avanza attraverso questo meccanismo ed il fronte di disidratazione procede dalla superficie esterna della matrice verso il centro (Green and Perry, 2007).

Il processo di essiccazione può avvenire in maniera naturale mediante esposizione al sole e/o all'aria o mediante opportune apparecchiature chiamate essiccatori.

L'essiccazione al sole del peperone di Senise, sebbene non utilizzi risorse energetiche e riduce l'impatto ambientale, presenta diversi aspetti negativi:

- non è un processo controllabile perché soggetto alle condizioni meteorologiche;

- non sempre rispetta gli standard di igiene perché l'alimento può essere contaminato da polvere, insetti, animali ed inquinanti;
- i lunghi tempi di essiccazione e la lunga esposizione all'aria possono comportare un'indesiderata variazione delle caratteristiche fisiche ed organolettiche del prodotto, ma anche un suo eccessivo deperimento chimico, enzimatico e microbiologico.

Per ovviare a questi aspetti negativi in questo lavoro è stata confrontata la tecnica tradizionale (esposizione al sole ed all'aria) con due tecniche di essiccazione termiche a convezione utilizzando un armadio essiccatore a ventilazione forzata con e senza flusso di aria secca.

Gli armadi a ventilazione forzata sono essiccatori costituiti da grandi armadi metallici dove il materiale viene essiccato da aria circolante scaldata da resistenze elettriche o da vapore che circola in tubi.

Il materiale da essiccare viene disposto a strati su griglie sovrapposte e la circolazione dell'aria è resa più efficiente da un ventilatore che ne aumenta la velocità.

### 3.1 Materiali e Metodi

#### 3.1.1 Processo di essiccazione e parametri operativi

Per le valutazioni sono stati utilizzati essiccatori presenti nella Hall Tecnologica del centro di Innovazione integrato “Agrobiopolis” del CR ENEA Trisaia. Nello specifico per le prove condotte con semplice ventilazione forzata dell’aria è stata usata una stufa termostata della BIBICASA (figura 4a). Mentre per le prove condotte con aria secca è stato utilizzato un armadio termostato della P-Selecta modello Hotcold-M (figura 4b) insufflando dalla bocchetta inferiore aria preventivamente essiccata mediante un essiccatore per aria compressa a ciclo frigorifero (Atlas Copco FD30).



Figura 4. Disposizione di bacche di peperoni per le prove di essiccazione in armadio termostato a ventilazione forzata (a) e con flusso di aria secca (b).

Le prove sono state condotte nel 2020 e 2021 con bacche di peperone della cultivar Senise. Il processo di essiccazione è stato condotto a 40 e 45 °C ed ogni 24 ore è stato determinato

il peso dei peperoni ed il calo peso percentuale (%CP) è stato calcolato mediante la seguente formula:

$$\%CP = [(peso\ iniziale - peso\ finale) \times 100] \div peso\ iniziale$$

Le prove sono state condotte in triplicato e per ogni prova sono stati utilizzati circa 2 kg di peperoni. Per confronto, le stesse quantità sono state anche essiccate mediante metodo tradizionale ovvero esponendo le serte all'aria.

Al termine del processo di essiccazione, ovvero quando il peso dei peperoni diventava costante, sul prodotto essiccato sono state condotte della analisi per determinare il contenuto di carotenoidi totali, acido ascorbico e fenoli totali.

### 3.1.2 Estrazione e quantificazione dei carotenoidi totali

Il peperone essiccato è stato finemente macinato mediante un macinino da laboratorio e circa 0,2 g sono stati sospesi in 5 ml di una miscela di esano-acetone-etile acetato (2:1:1 v/v) stabilizzata con 0,01% BHT (butilidrossitoluene) ed estratte mediante vortex per 5 minuti. La sospensione risultante è stata centrifugata a 8900 RCF, 5 °C per 10 minuti (centrifuga Beckman Coulter Allegra TM 2IR). Il surnatante è stato recuperato e la sospensione solida è stata utilizzata per l'estrazione completa dei carotenoidi. Il processo di estrazione è stato ripetuto 3 volte. L'intero solvente (15 mL) è stato concentrato a 35 °C con un evaporatore rotante (Steroglass Rotary Evaporator Instruments Kentron - Strike 202). Gli estratti sono stati risospesi in etanolo per la quantificazione dei carotenoidi totali mediante tecnica spettrofotometrica ovvero è stata direttamente misurata l'assorbanza del campione in uno spettrofotometro (Thermo Scientific-Multiscan GO). La concentrazione dei carotenoidi totali (TC) è stata stimata a partire dall'assorbanza massima a 448 nm, utilizzando l'equazione descritta da Davies 1976 mediante la seguente formula:

$$TC (\mu g) = \frac{A \times V \times 10^4}{E_{1cm}^{1\%}}$$

dove, A è il valore di assorbanza; V è il volume totale del campione (mL);  $E_{1cm}^{1\%}$  è il coefficiente di estinzione del  $\beta$ -carotene in etanolo (2620 mL/g cm).

La concentrazione di carotenoidi è stata espressa in termini di carotenoidi totali per 100 grammi di peperone essiccato (mg/100 g DW).



### 3.1.3 Estrazione e dosaggio del contenuto di acido ascorbico e dei fenoli totali

La polvere di peperone macinato circa 0,2 g di ciascun campione è stata sottoposta ad estrazione utilizzando una miscela metanolo/acqua (60/40, v/v) in un rapporto di 1:50 (campione/solvente, p/v).

È stato utilizzato un omogeneizzatore (T25 basic-IKA Labortechnik) per 1 minuto a 8500 giri/min, seguito da sonicazione (Sonorex Super 10 P-Brandelin) per 5 minuti, a temperatura ambiente e la procedura è stata ripetuta tre volte.

La miscela è stata quindi centrifugata (Laborfuge 400R-Heraeus Instruments) a 3200 RCF, 4 °C per 15 min. Il sovranatante è stato utilizzato per determinare il contenuto di acido ascorbico utilizzando con modifiche la reazione del blu di Prussia (Matei et al. 2012) ed il contenuto fenolico totale (TPC) utilizzando il test Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965).

Per il contenuto di acido ascorbico, una miscela di soluzioni acquose di cloruro di ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ , 1%) e esacianoferrato di potassio (III) ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 1%) è stata preparata al momento in una proporzione 2:1. L'estratto metanolico (25  $\mu\text{L}$ ) è stato trasferito in 2975  $\mu\text{L}$  di acqua distillata e sono stati aggiunti 0,5 mL della miscela di reagenti. Dopo 10 minuti, l'assorbanza è stata misurata a 700 nm, mentre per la calibrazione è stato utilizzato uno standard commerciale di acido ascorbico. I risultati sono stati espressi come mg equivalenti di acido ascorbico per g di campione (base DW).

Per la determinazione del contenuto fenolico totale (TPC), 100  $\mu\text{L}$  dell'estratto del campione sono stati miscelati con 1,5 ml di acqua distillata e poi con 125  $\mu\text{L}$  di reattivo di Folin-Ciocalteu. Dopo 5 minuti, la miscela è stata neutralizzata mediante l'aggiunta di 375  $\mu\text{L}$  di soluzione acquosa al 20% di carbonato di sodio e 475  $\mu\text{L}$  di acqua distillata. Dopo 10 minuti di equilibratura, l'assorbanza è stata misurata a 765 nm. L'acido gallico è stato utilizzato come equivalente standard e i risultati sono stati calibrati ed espressi in mg equivalente di acido gallico per g di campione (base DW) (Basheer et al., 2021).

## 3.2 Risultati

### 3.2.1 Riduzione in peso e valutazione del contenuto di carotenoidi totali, di acido ascorbico e dei fenoli totali

Dalle esperienze condotte, come possibile notare della figura 5, risulta evidente che ad entrambe le temperature il processo di essiccazione più efficace è risultato quello con flussaggio di aria secca.

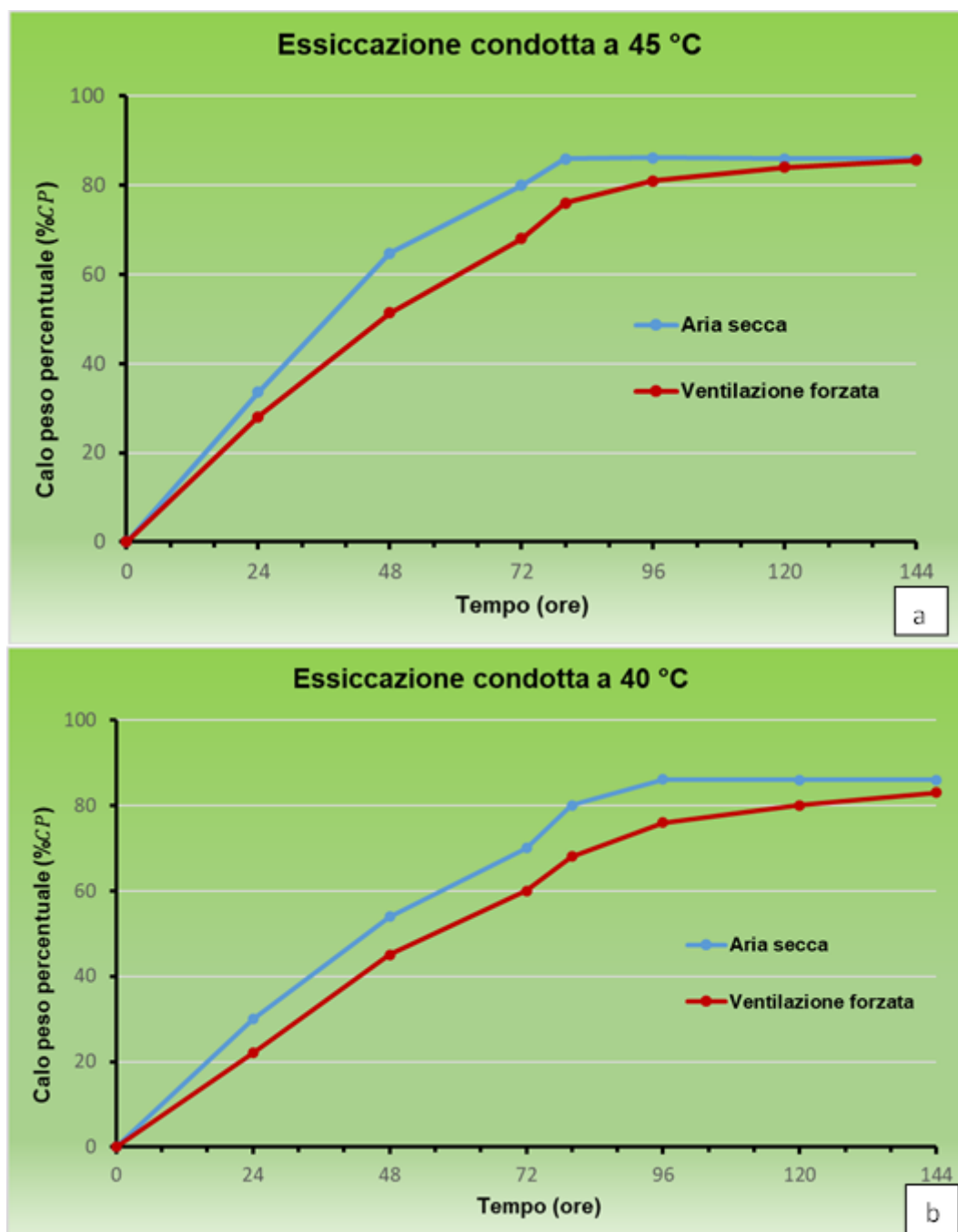


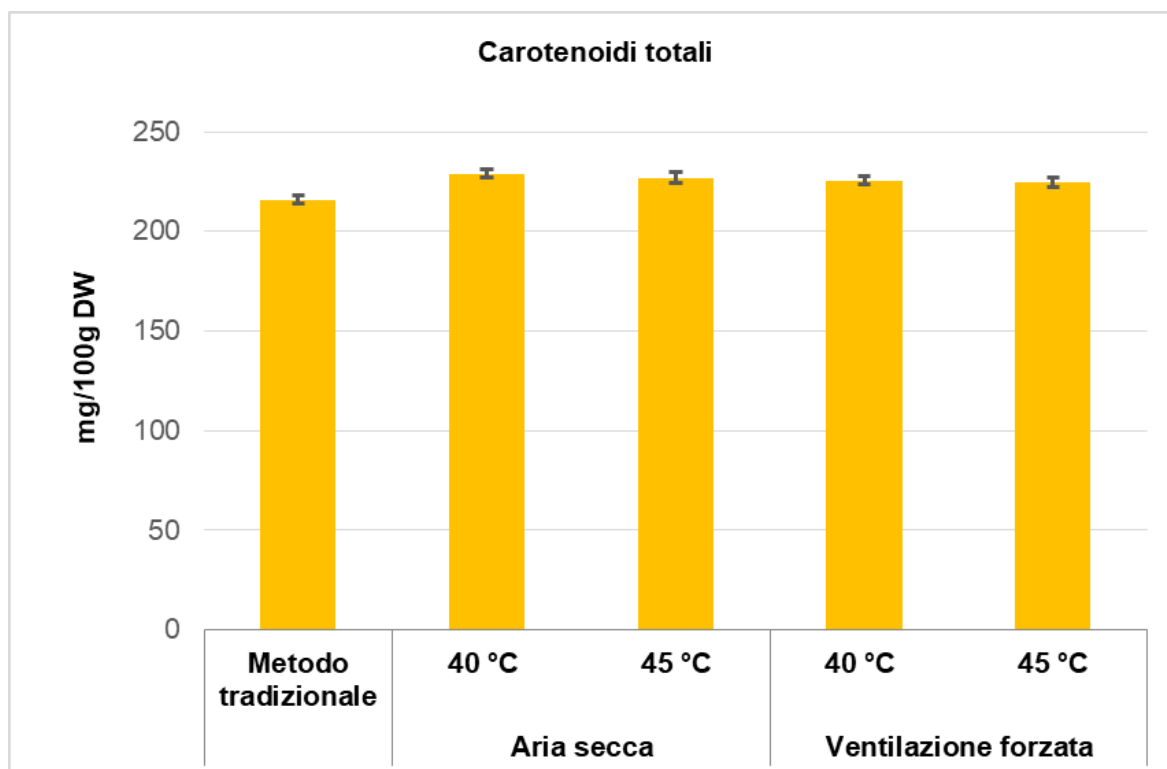
Figure 5. Riduzione in peso dei peperoni durante l'essiccazione in armadi a ventilazione forzata e con flusso di aria secca a 45 °C (a) e a 40 °C (b).

In particolare, la durata del processo di essiccazione più breve è stato quello a 45 °C registrando un calo peso percentuale di circa l'86% dopo 80 ore mentre a 40 °C lo stesso risultato era raggiunto dopo 96 ore. Anche con la ventilazione forzata si è osservata una riduzione del tempo di essiccazione di 24 ore conducendo il processo a 45 °C.

Più in generale, un calo peso medio percentuale di almeno l'83% è stato raggiunto alla fine di tutte le prove, sebbene utilizzando aria secca il processo è risultato più breve e durava circa 48 ore in meno rispetto all'impiego della sola ventilazione forzata.

Dalle analisi chimiche effettuate su aliquote di peperoni delle differenti prove e sui peperoni essiccati con metodica tradizionale sono state evidenziate differenze nel contenuto di carotenoidi totali, acido ascorbico e fenoli totali.

Dalla figura 6 è possibile notare una lieve differenza in termini di carotenoidi totali tra i campioni essiccati a 40 e 45 °C, sia con ventilazione forzata sia con flusso di aria secca, rispetto a quelli essiccati tradizionalmente. Infatti, a 40 °C con aria secca è stato raggiunto il valore più alto pari a 229,08 mg/100g<sub>(DW)</sub>, mentre con il metodo tradizionale è stato raggiunto il valore di 216,3 mg/100g<sub>(DW)</sub>.



**Figura 6. Determinazione dei carotenoidi totali mediante metodica spettrofotometrica su campioni essiccati con differenti metodi e temperature.**

In figura 7 si può notare come nei frutti essiccati tradizionalmente il contenuto di acido ascorbico (640,87 mg/100g<sub>(DW)</sub>) era significativamente inferiore rispetto a quello rilevato nei peperoni essiccati sia con ventilazione forzata sia con flusso di aria secca. I campioni essiccati con la sola ventilazione forzata hanno presentato contenuti di acido ascorbico di 1040,37 e 980,92 mg/100g<sub>(DW)</sub> rispettivamente a 40 e 45 °C; mentre quelli essiccati con aria secca sono stati ottenuti valori di 1036,66 e 981,89 mg/100g<sub>(DW)</sub> a 40 e 45 °C, rispettivamente.

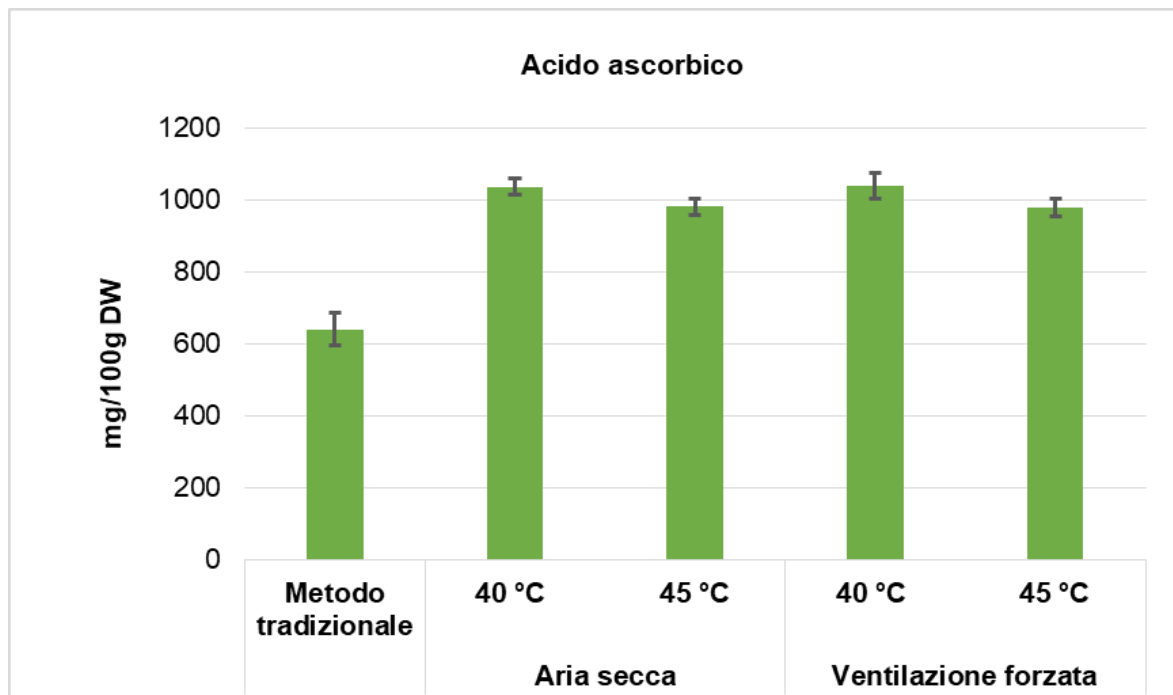


Figura 7. Determinazione del quantitativo di acido ascorbico su campioni essiccati con differenti metodi e temperature.

Infine, il contenuto di polifenoli totali, così come mostrato in figura 8, è lievemente ridotto sui campioni essiccati con la metodica tradizionale rispetto a quelli ottenuti con gli essiccatori. Nel dettaglio i fenoli totali rilevati ed espressi come mg equivalenti di acido gallico erano 890,13 con il metodo tradizionale; 996,1 e 944,87 con aria secca a 40 e 45 °C; 965,2 e 889,29 con ventilazione forzata a 40 e 45 °C.

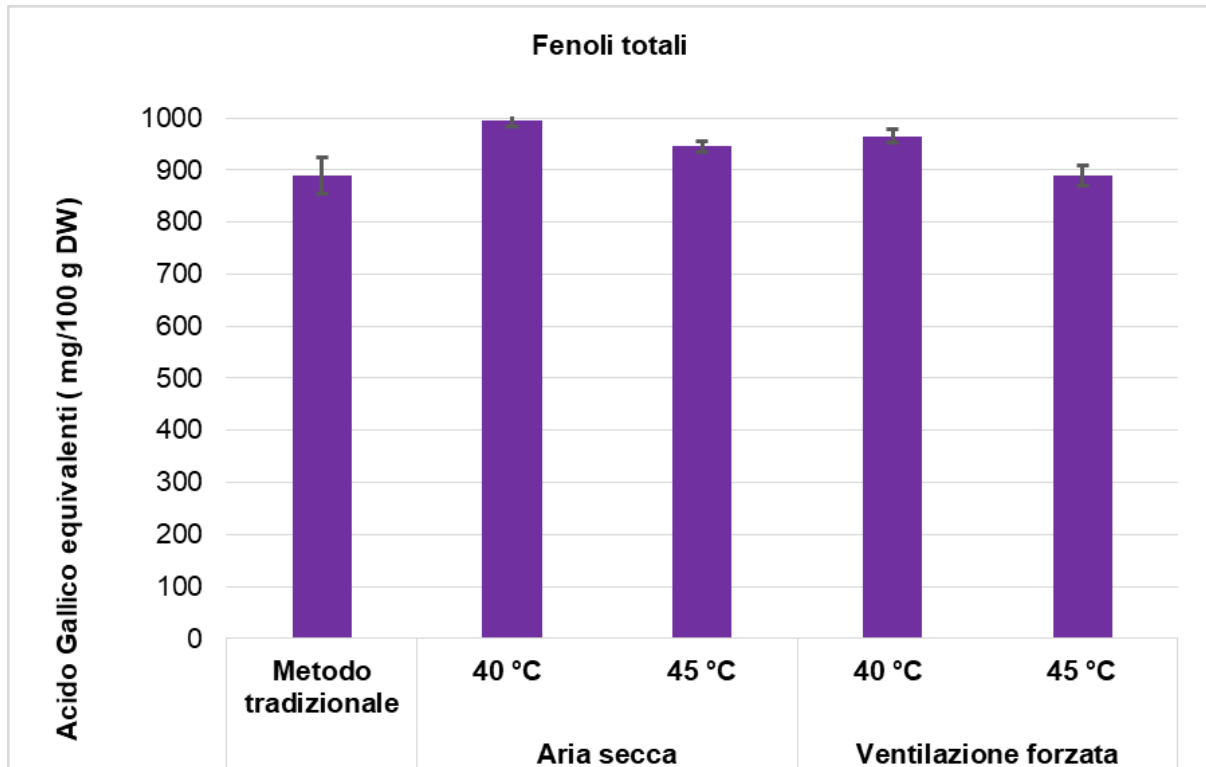


Figura 8. Determinazione del quantitativo di fenoli totali mediante metodica Folin-Ciocalteu su campioni essiccati con differenti metodi e temperature.

#### **4 Valutazione dell'impiego della tecnica estrattiva mediante CO<sub>2</sub> supercritica per il recupero di carotenoidi da peperoni non idonei alla commercializzazione.**

I carotenoidi sono una famiglia di composti ampiamente presenti in natura e sono responsabili del colore di molti frutti e verdure. Agiscono come inibitori dei radicali liberi e antiossidanti lipidici negli organismi vegetali e animali (Krinsky and Johnson, 2005).

I carotenoidi hanno un ruolo importante nella promozione della salute e sono utilizzati come coloranti naturali. Pertanto, esiste un crescente interesse per questi composti in vari settori ed il mercato globale si stima che crescerà da 1,5 miliardi di dollari nel 2019 a 2,0 miliardi di dollari nel 2026 (MarketsandMarkets, 2020).

Attualmente, l'ottenimento di questi composti da fonti naturali è una sfida molto importante per la ricerca che viene ulteriormente supportata dalle preferenze dei consumatori e dai benefici per la salute (Anaya-Esparza et al., 2021).

Addirittura sembrerebbe che i carotenoidi naturali superino in efficacia quelli di origine sintetica e che non mostrino effetti tossici o cancerogeni (Silva et al. 2022).

Un'ottima fonte di queste sostanze è rappresentata appunto dai frutti rossi di peperone (*C. annuum* L.) in cui il principale carotenoide presente è la capsantina oltre a contenere anche capsorubina,  $\beta$ -carotene, zeaxantina, violaxantina,  $\beta$ -criptoxantina e luteina (Kim et al., 2017).

Secondo quanto riportato in letteratura, questi carotenoidi sono precursori della vitamina A. Inoltre, hanno un effetto positivo sul livello del colesterolo nel plasma riducendo il rischio cardiovascolare (Gnayfeed et al., 2001; Maoka, 2009; Matsufuji et al., 1998; Stahl and Sies, 2005).

In generale, per ottenere i carotenoidi da matrici naturali come il peperone, si rende necessaria l'estrazione con solventi organici e metodi non convenzionali come le estrazioni assistite da microonde e da ultrasuoni. Tuttavia, per queste tecniche, i lunghi tempi di estrazione, la mancanza di selettività, la presenza di residui di solventi tossici nel prodotto finale e la degradazione dei composti sensibili alla temperatura sono tra i principali inconvenienti (Kostrzewa et al., 2022). Questi possono essere evitati utilizzando la tecnica green di estrazione che impiega l'anidride carbonica in condizioni supercritiche (SC-CO<sub>2</sub>) come solvente.

In letteratura sono diversi gli articoli che riportano l'impiego della SC-CO<sub>2</sub> per il recupero di carotenoidi da peperoni (de Aguiar et al. 2013; Shah et al. 2020), tuttavia, sulla base delle nostre conoscenze, mancano informazioni sui parametri ottimali per estrarre carotenoidi dal peperone di Senise utilizzando SC-CO<sub>2</sub>.

Pertanto, lo scopo di questo studio nell'ambito del progetto TInnoGePra è stato quello di valutare l'estrazione di molecole bio-funzionali, come i carotenoidi, da scarti di produzione del peperone di Senise.

Le prove sono state condotte valutando differenti parametri operativi su un impianto scala banco (figura 9) presente presso il laboratorio di chimica analitica del CR ENEA di Trisaia.



**Figura 9. Impianto scala banco di estrazione a fluidi supercritici dell'Applied Separations Spe-ed SFE-2 utilizzato per le prove.**

#### **4.1 Cenni sulla tecnologia estrattiva mediante CO<sub>2</sub> supercritica e descrizione dell'impianto**

L'estrazione con fluidi supercritici rappresenta una valida alternativa alle estrazioni convenzionali, in quanto permette di ottenere prodotti dall'elevata purezza sostituendo i solventi organici tossici per l'uomo e per l'ambiente con i fluidi supercritici. Si definisce fluido supercritico, una sostanza o una miscela in condizioni di temperatura e di pressione superiori a quelle relative al suo punto critico.

Il fluido supercritico ha caratteristiche intermedie tra quelle di un gas e quelle di un liquido ed infatti, come un liquido, ha elevata densità e bassa comprimibilità, mentre la sua elevata diffusività e bassa viscosità sono quelle tipiche dei gas (Vafaei et al., 2022).

Per quanto riguarda la capacità solvente di un fluido supercritico, essa è paragonabile a quella di un liquido di uguale polarità ma, a differenza dei liquidi, è in grado di penetrare come un gas all'interno della matrice solida.

La possibilità di variare la pressione e la temperatura del processo, quindi di modulare la capacità estrattiva dei fluidi, rende le estrazioni in condizioni supercritiche selettive nei confronti di alcune categorie di sostanze, permettendo di ottenere prodotti dall'elevata purezza. In questo modo si evitano anche le successive fasi di recupero dei solventi previste dalle altre tipologie estrattive (Di Sanzo et al., 2018).

Particolare attenzione per il suo potenziale di solvente allo stato supercritico ha la CO<sub>2</sub>, un gas non tossico, non infiammabile, stabile, economico e riciclabile; il suo impiego su vasta scala ne incentiverebbe la cattura dall'atmosfera contribuendo a bilanciare le emissioni di gas serra.

La CO<sub>2</sub> raggiunge lo stato supercritico alla temperatura di 31,1 °C e alla pressione di 73,8 bar. È selettiva verso i composti apolari o debolmente polari ma, grazie all'uso combinato con un modificatore di polarità, come l'etanolo, che funge da co-solvente, permette di estrarre anche composti polari (Larocca et al., 2023).

L'estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica, grazie alla versatilità conferitale dall'azione combinata di pressione e temperatura, permette di estrarre composti termosensibili.

L'impianto estrattivo a CO<sub>2</sub> supercritica utilizzato per le prove, rappresentato schematicamente in figura 10, è costituito dai seguenti componenti:

- V-01/06: Valvole di regolazione manuale;
- P-101: Pompa della CO<sub>2</sub>;
- P-102: Pompa del co-solvente;
- E-101: Preriscaldatore (Oven);
- FI: Flussimetro;
- Vent-01/02: Valvole di sfiato manuali;
- T-101: Vessel di Estrazione.

Si tratta di un apparecchio scala banco utile per eseguire studi preliminari sulla fattibilità della tecnica estrattiva. È dotato di un forno riscaldante che può raggiungere la temperatura massima di 250 °C e di un sistema di pompaggio (pompa pneumatica) in grado di comprimere la CO<sub>2</sub> fino a 680 bar. Consente di operare in modo statico o dinamico.

La temperatura di estrazione impostata viene controllata grazie ad un accurato sistema di termocoppie.



Un allarme acustico e visivo permette il controllo della pressione. Il sistema di sicurezza è rappresentato da un disco di rottura.

È presente anche un sistema di raffreddamento della testata della pompa di CO<sub>2</sub> che rende possibile l'utilizzo di normali bombole di anidride carbonica con tubo pescante.

L'aggiunta di co-solvente può essere effettuata utilizzando un'apposita pompa a siringa (Modulo pompa modificatore Speed SFE-PN 7170-Applied Separations).

L'apparecchiatura presenta un vessel di preriscaldamento della CO<sub>2</sub> ed uno di caricamento della matrice da trattare.

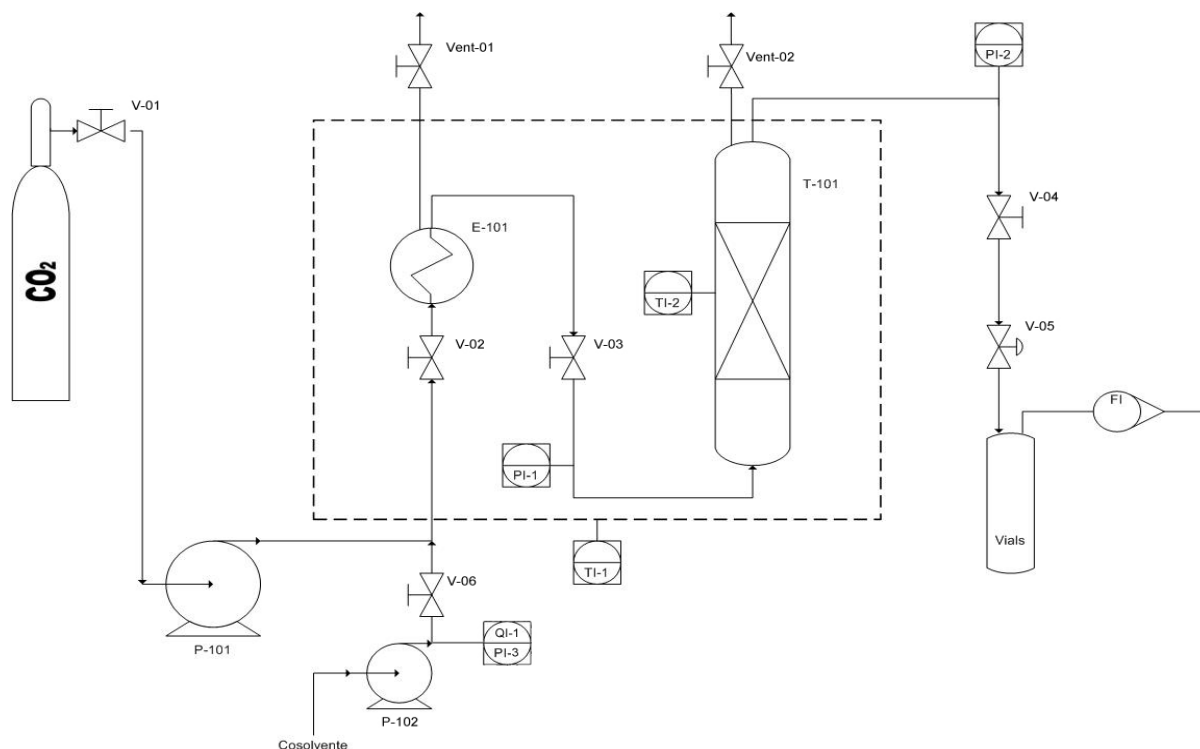
Come recipienti di estrazione possono essere utilizzati tubi in acciaio inossidabile con diverse capacità (32, 50 e 300 mL).

Sono presenti a monte ed a valle del vessel di estrazione due misuratori di pressione della Wika Transmitter aventi un campo di misura compreso tra 0,6 mbar e 15.000 bar. Questi permettono di valutare la presenza di eventuali perdite di carico e di modifiche sostanziali di pressione durante le prove.

L'alimentazione di CO<sub>2</sub> viene regolata da una valvola micrometrica indipendente fino a 10 L/min utilizzando un flussimetro (LPN/S80 ALG 2.5, Sacofgas, Italia).

L'estratto fuoriesce, insieme alla CO<sub>2</sub>, dall'estremità di un capillare e viene raccolto in una vial.

Tutti i parametri sono controllati dal software EasyCom2011 versione 2.0.5.16 (WIKI Alexander Wiegand SE & Co. KG).



**Figura 10. Schema dell'impianto a fluidi supercritici (CO<sub>2</sub>-SC) scala banco utilizzato.**

## 4.2 Materiali e metodi

### 4.2.1 Condizioni operative dell'estrazione di carotenoidi da peperoni della cultivar Senise con CO<sub>2</sub> supercritica

Frutti freschi di peperoni della cultivar Senise che presentavano difetti visivi di natura fisiologica o dovuti all'attacco di microorganismi e/o insetti, quindi non idonei alla commercializzazione, sono stati selezionati nella stagione di raccolta 2021 da campi dell'agro senisese.

I peperoni sono stati essiccati mediante armadi a ventilazione forzata a 40 °C e successivamente il frutto privato dai semi è stato macinato con un mulino da laboratorio (Waring commercial laboratory Blender) e poi conservato sottovuoto e al riparo dalla luce fino al suo utilizzo per le prove di estrazione.

Queste sono state condotte caricando 5 gr di polvere (figura11) in un vessel di estrazione dal volume di 50 mL (figura 12) precedentemente riempito per il 60% con sfere di vetro dal diametro di 3 mm. Per evitare il trasporto di materiale sono stati utilizzati filtri metallici con pori da 5 micron.



Figura 11. Peperone di Senise macinato.



Figura 12. Vessel di estrazione da 50 mL.

Il vessel è stato inserito nell'impianto, riempito con anidride carbonica e una volta raggiunte le condizioni operative (riassunte in tabella 1) le estrazioni sono state condotte in dinamico per 60 minuti con un flusso costante di CO<sub>2</sub> di 5 litri al minuto.

**Tabella 1. Condizioni operative adottate durante le prove di estrazioni condotte a flusso costante di 5 litri al minuto di CO<sub>2</sub> per 60 minuti.**

Condizioni operative	
Temperatura (°C)	Pressione (bar)
40	300
	400
	500
50	300
	400
	500
60	300
	400
	500

Come separatori, sono state utilizzate vial di vetro immerse in un bagno termostatico mantenuto alla temperatura di 25 °C. Il prodotto raccolto nella singola vial (figura 13) è stato pesato mediante bilancia analitica (Kern, model 870) e la resa di estrazione è stata espressa in valori percentuali del rapporto tra i grammi di estratto ed i grammi di campione.



**Figura 13. Vial contenente l'estratto di peperone ottenuto mediante estrazione con SC-CO<sub>2</sub>.**

Successivamente le vial sono state crioconservate a -20 °C fino al loro successivo utilizzo per le analisi atte a determinare il contenuto di carotenoidi totali mediante la metodica spettrofotometrica già descritta nel paragrafo 3.1.2, ed il loro profilo cromatografico mediante analisi HPLC.

#### 4.2.2 Determinazione del profilo dei carotenoidi presenti negli estratti mediante HPLC

Il contenuto di una vial è stato risospeso in 10 mL di alcol etilico più BHT allo 0,1% ed il campione è stato analizzato direttamente e dopo saponificazione. Quest'ultima è stata eseguita in una falcon da 15 mL, miscelando 1 mL di sospensione dell'estratto, 0,2 mL di NaCl (10 g/L) e 0,3 mL di KOH (600 g/L). La miscela ottenuta è stata agitata mediante vortex e poi mantenuta a bagnomaria alla temperatura di 75 °C per 45 minuti.

Per le analisi, aliquote di 20 µL degli estratti filtrati sono state iniettate nel sistema HPLC Agilent serie 1200 (Figura 14) dotato di modulo di degasaggio (G1379B), pompa binaria (G1312B), campionatore automatico (G1367B), compartimento colonne (G1316A), rilevatori UV-Vis (G1314B) e a serie di diodi (DAD) (G1315A).

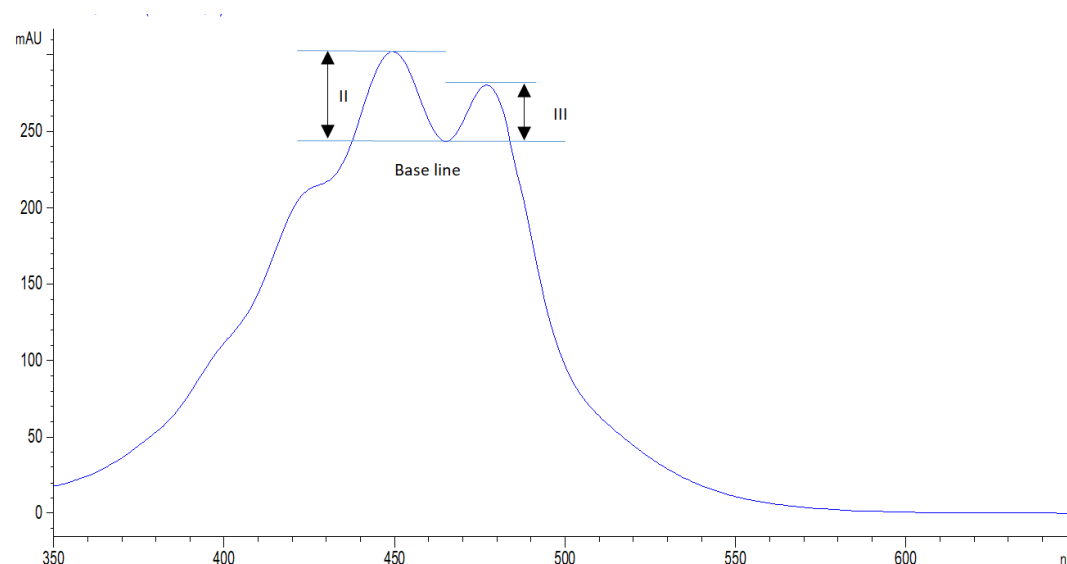


Figura 14. Sistema HPLC Agilent serie 1200 usato per determinare il profilo dei carotenoidi.

La separazione cromatografica è stata condotta mediante una colonna analitica a fase inversa C18 (Zorbax RX-C18 4,6 × 250 mm, 5 µm) usando acetone (solvente A) ed acqua

(solvente B) come fase mobile al flusso di 1 mL al minuto e alla temperatura di 25 °C in gradiente come di seguito: 75% A (composizione iniziale), da 0 a 10 minuti dal 75% A al 95% A; da 10 a 17 minuti al 95% A; da 17 a 20 minuti dal 95% A al 100% A; da 20 a 30 minuti al 100% A; da 30 a 35 minuti gradiente lineare di ritorno alle condizioni iniziali (75% A).

Il rilevamento diretto dell'assorbanza è stato eseguito alla lunghezza d'onda caratteristica del  $\beta$ -carotene (453 nm) e gli spettri dei relativi segnali sono stati acquisiti tra 350 e 650 nm. I principali picchi sono stati identificati confrontando gli spettri e le relative lunghezze d'onda per l'assorbanza massima ( $\lambda_{max}$ ) con i dati di letteratura. Inoltre, sono stati calcolati i microgrammi dei singoli carotenoidi come  $\beta$ -carotene equivalenti e allo scopo  $\beta$ -carotene sintetico, acquistato da Sigma-Aldrich (PHR1239-1G), è stato sciolto in esano e diluito in etanolo con BHT per preparare soluzioni madre standard ed è stata ottenuta una curva di calibrazione con le concentrazioni di 0,024, 0,012, 0,006, 0,0012 e 0,0006 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. Tutti i dati sono stati raccolti e analizzati utilizzando il software OpenLAB CDS Chemstation Edition Rev. C.01.10(201). Per avere un'idea della struttura fine spettrale, è stato calcolato il rapporto percentuale (%III/II) tra la differenza di assorbanza tra terzo picco e linea di base (intesa come valle tra i due picchi) e la differenza di assorbanza tra quella del secondo picco e la linea di base ( $(\lambda_{III} - \lambda_{baseline})/(\lambda_{II} - \lambda_{baseline})$ ). Per una migliore comprensione si riporta in figura 15 lo spettro della luteina con le relative informazioni utili per il calcolo del %III/II.



**Figura15. Esempio di calcolo di %III/II della struttura fine spettrale.**

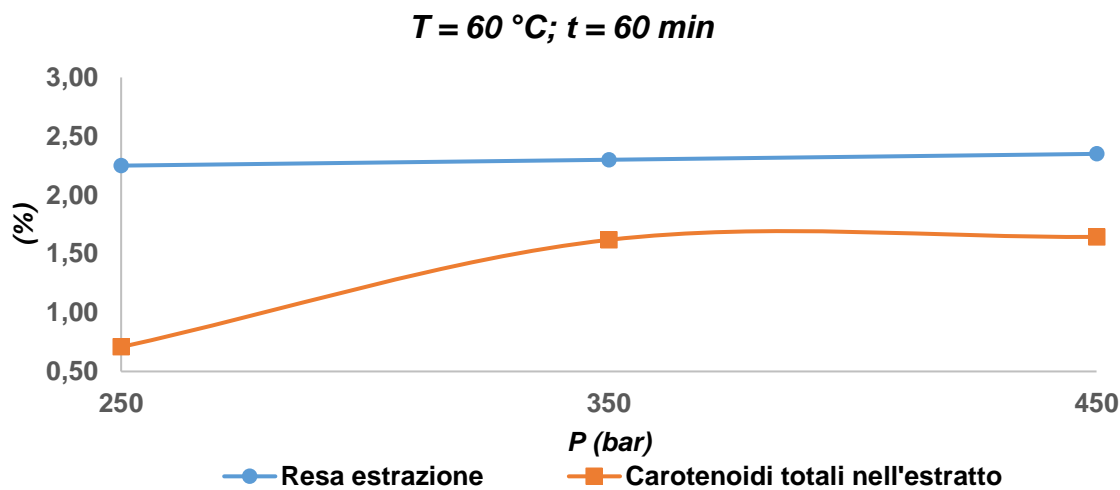
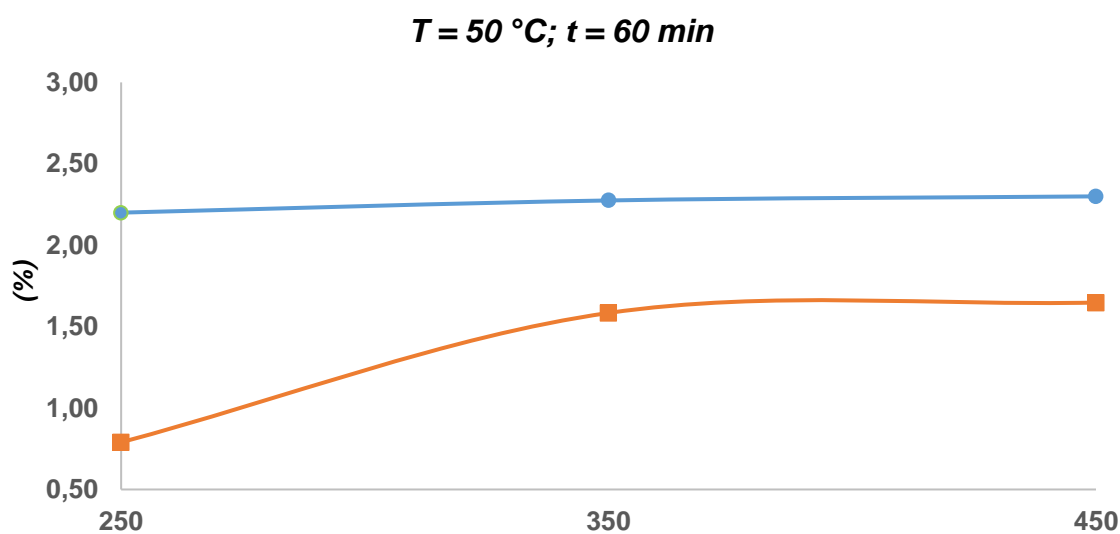
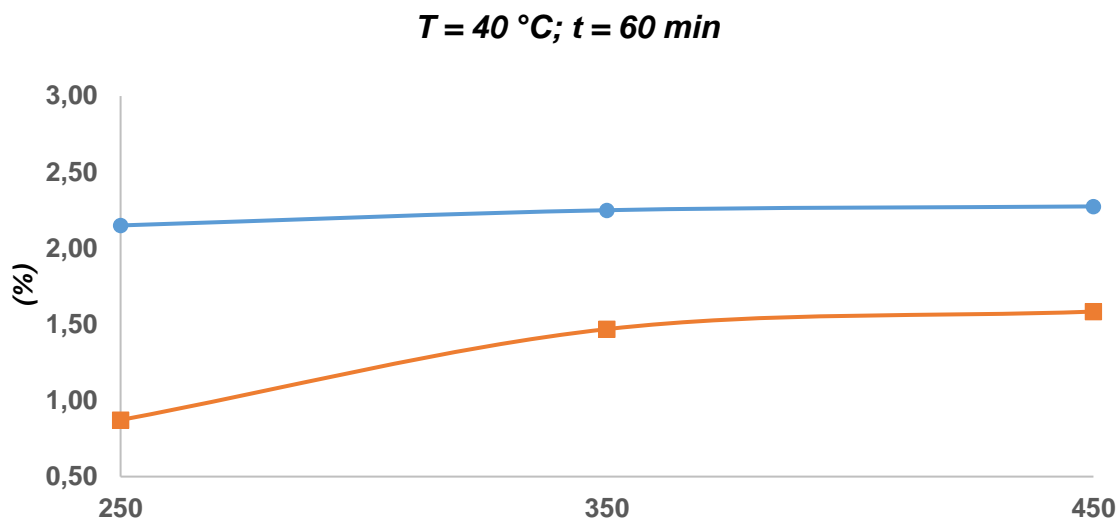
## 4.3 Risultati

### 4.3.1 Estrazione mediante CO<sub>2</sub> supercritica: resa di estrazione e contenuto di carotenoidi nell'estratto.

I risultati in termini di resa estrattiva e contenuto di carotenoidi totali nell'estratto, ottenuti dal piano sperimentale presentato in tabella 1 per l'estrazione da peperoni secchi della cultivar Senise mediante CO<sub>2</sub> supercritica, sono mostrati in figura 16 e 17.

La resa estrattiva nell'area sperimentale studiata era compresa tra il 2,15 e 2,35% ed il valore massimo è stato raggiunto a 450 bar e 60 °C. Dai risultati emerge che ad un aumento di pressione non corrisponde un importante aumento in termine di resa di estrazione ma si osserva un sensibile aumento del contenuto di carotenoidi totali nell'estratto. In particolare, il contenuto di carotenoidi variava dallo 0,71 al 1,65% ed il valore più elevato è stato ottenuto ad una pressione di 450 bar e temperatura di 50 °C.

Viceversa, dai risultati ottenuti si osserva che incrementando la temperatura, mantenendo la pressione costante, i valori in termini di resa e di carotenoidi nell'estratto non erano significativamente diversi. Addirittura, sembrerebbe che alla pressione di 250 bar l'incremento della temperatura si traduca in una riduzione del contenuto di carotenoidi totali nell'estratto.



**Figura 16. Rese di estrazioni e percentuali di carotenoidi totali ottenute dopo 60 minuti mantenendo costante la temperatura e variando le pressioni.**

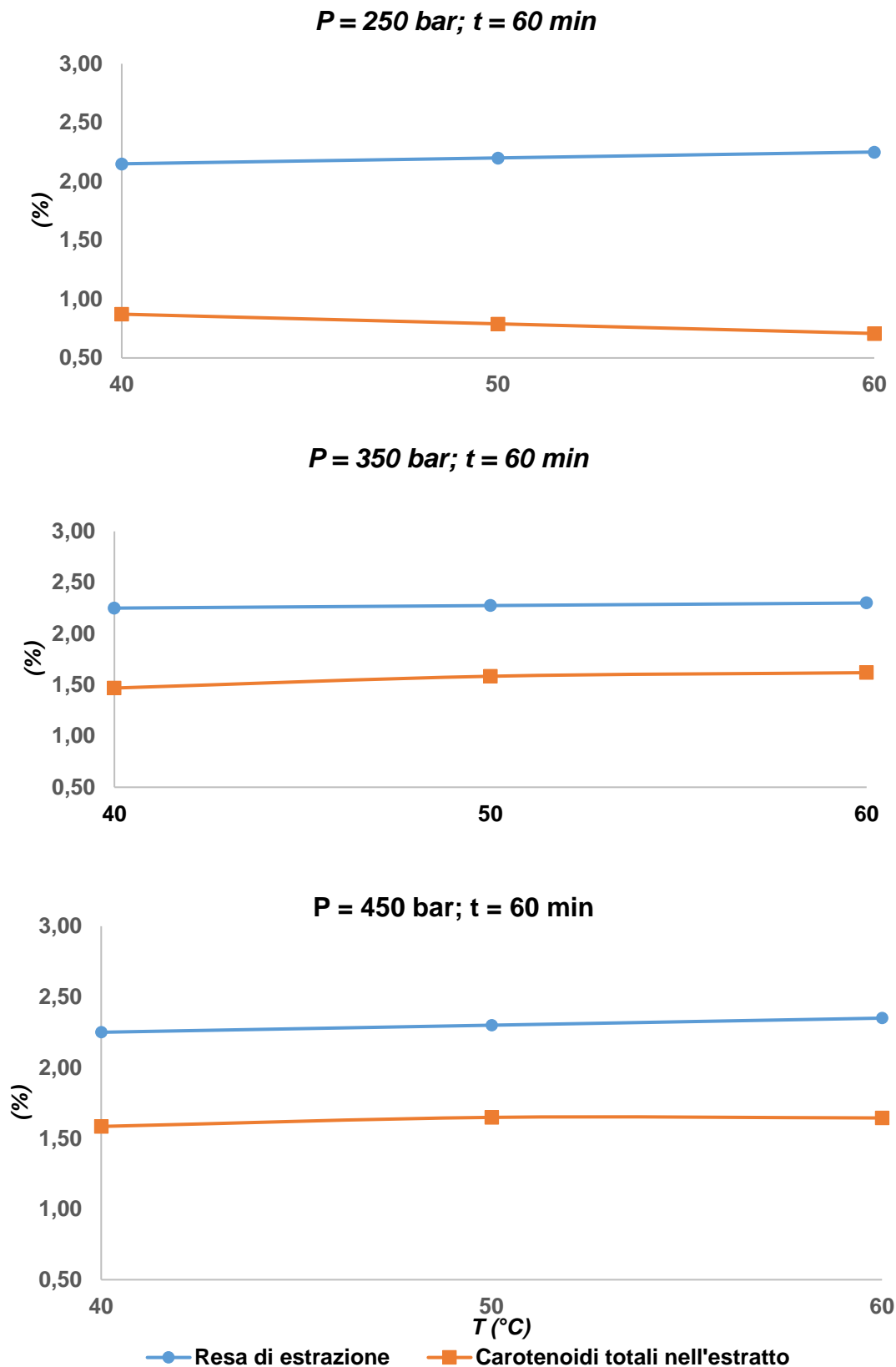
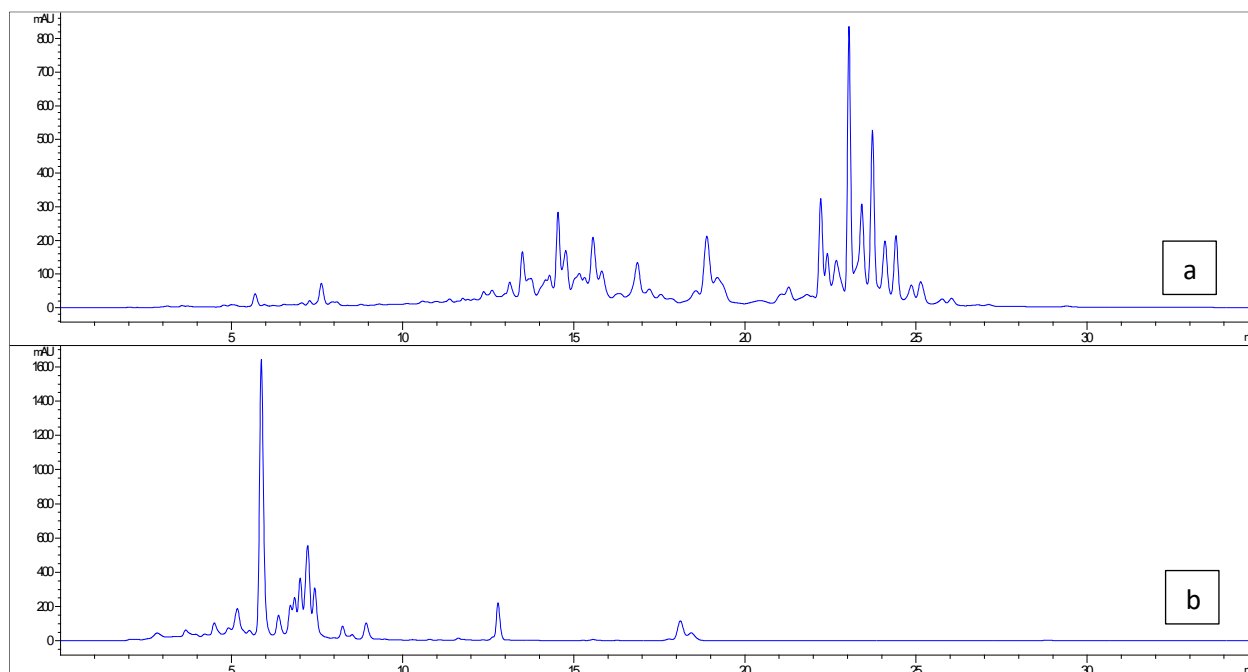


Figura 17. Rese di estrazioni e percentuali di carotenoidi totali ottenute dopo 60 minuti mantenendo costante la pressione e variando le temperature.



#### 4.3.2 Analisi cromatografica mediante HPLC del profilo dei carotenoidi presenti negli estratti di peperone.

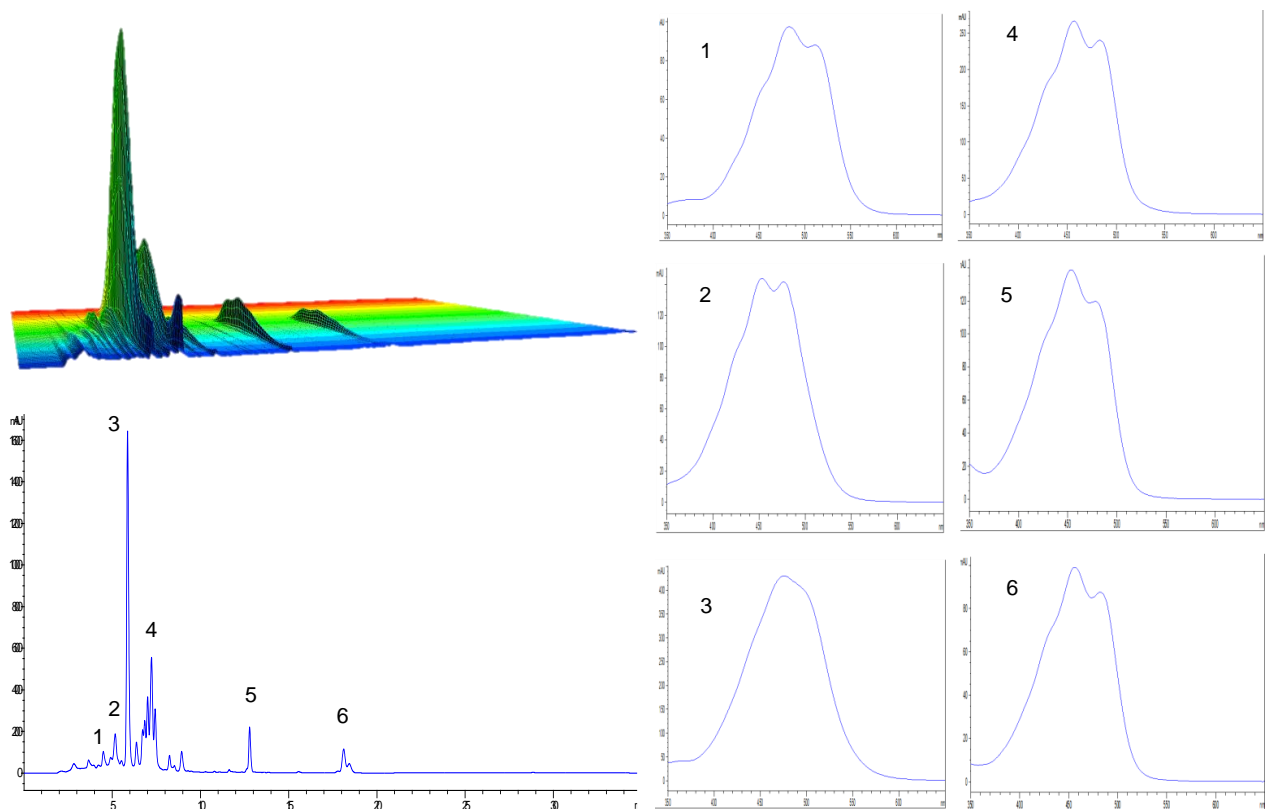
Dalle analisi cromatografiche condotte con HPLC-DAD, come mostrato in figura 18, è possibile notare che il processo di saponificazione ha permesso l'idrolizzazione permettendo la quantificazione di xantofille potenzialmente esterificate con acidi grassi.



**Figura 18. Overlay dei cromatogrammi rispettivamente prima (a) e dopo (b) la saponificazione dell'estratto di peperone rosso ottenuto mediante CO<sub>2</sub> supercritica a pressione e temperatura di 350 bar e 40 °C.**

I principali picchi rilevati nel cromatogramma mostrato in figura 19 possono essere associati ai seguenti carotenoidi: capsorubina, luteina, capsantina, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina e  $\beta$ -carotene.

Non sono state osservate importanti differenze nel rapporto percentuale tra i vari carotenoidi presenti negli estratti ottenuti alle diverse condizioni operative. Pertanto, in tabella 2 sono riassunte, a titolo di esempio, le caratteristiche cromatografiche e UV-Vis di un estratto di peperone ottenuto alle condizioni operative di 350 bar e 40 °C. In particolare, il contenuto di capsantina era pari a 5,14 mg/g di estratto ed in tutti gli estratti rappresentava il carotenoide principale con un valore medio di circa il 35%.



**Figura 19. Cromatogramma dell'estratto di peperone rosso (*Capsicum annum* di cv. Senise) ottenuto mediante estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica a pressione e temperatura di 350 bar e 40 °C. Lato sinistro sono rappresentati la scansione 3D rilevata tra 350 e 650 nm ed il relativo cromatogramma acquisito a 453 nm. Lato destro sono rappresentati gli spettri dei principali picchi.**

Tabella 2. Caratteristiche cromatografiche e UV-Vis, dei carotenoidi estratti da peperone rosso (*Capsicum annum* cv. Senise) ottenute mediante estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica a pressione e temperatura di 350 bar e 40 °C.

Picco	Composto	RT (min)	Baseline (nm)	*λ max (nm)	*%III/II	#Resa car (µg/g)
1	Capsorubina	4,574	505	456,484,513	12,5	5,49
2	Luteina	5,247	468	457,479	66,66	13,60
3	Capsantina	5,95	---	478	0	116,27
4	Zeaxantina	7,304	476	459,484	30,6	43,85
5	β-criptoxantina	12,864	473	429,457,482	10,3	14,27
6	β-carotene	18,194	473	458,485	38,57	12,93

\*rilevate mediante HPLC-DAD usando acetone e acqua come fase mobile; #rese espresse come microgrammi di β-carotene equivalenti per grammo di peperone secco.

## 5 Discussione

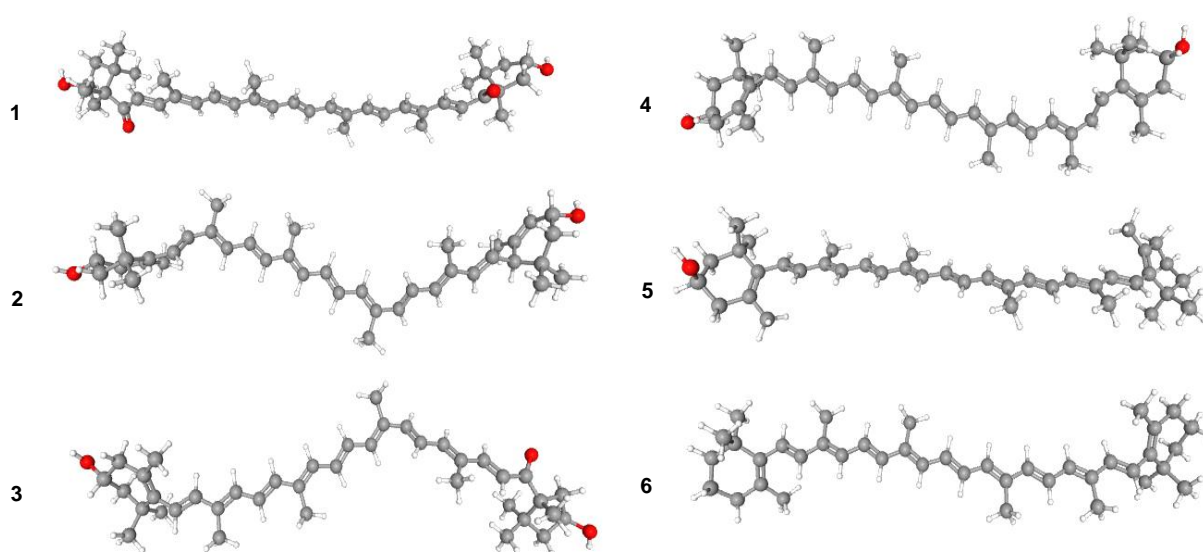
Le metodiche di essiccazione valutate hanno permesso di ridurre notevolmente il tempo di disidratazione dei peperoni e quindi di evitare potenziali problematiche correlate alla proliferazione di microrganismi causali di marciumi nonché della produzione di tossine nel prodotto. Inoltre, dai nostri risultati appare evidente anche un netto miglioramento nella preservazione dell'acido ascorbico; infatti, con il metodo di essiccazione tradizionale il suo contenuto presente nei peperoni è circa il 40% in meno di quello ottenuto con gli altri due metodi. In quest'ultimi la resa di acido ascorbico si riduce leggermente con la temperatura, in particolare del 5,3% nel metodo con l'aria secca e del 5,7% nel metodo con la ventilazione forzata. Osservazioni simili riguardo al contenuto di acido ascorbico sono state anche riportate da altri autori. Toontom et al. 2012 riportavano che il contenuto di acido ascorbico in peperoni essiccati al sole era inferiore rispetto a quello ottenuto con essiccazione con aria calda a 60 °C. Infatti, il contenuto di acido ascorbico durante l'essiccazione tradizionale potrebbe diminuire per l'effetto della luce e del lungo periodo di essiccazione (Howard et al. 1994; Vega-Gálvez et al. 2008). Mentre, similamente a quanto osservato da Jiménez et al. 2021, sembra che i metodi di essiccazione non influenzino in modo significativo il contenuto dei carotenoidi totali e dei fenoli totali.

In un approccio di bioeconomia circolare, peperoni rossi (*C. annuum* L.) che vengono eliminati come rifiuti a causa della loro scarsa qualità per la commercializzazione, sono stati utilizzati come materia prima per valutare il recupero di composti bioattivi come i carotenoidi mediante tecnica della CO<sub>2</sub> supercritica. A tal proposito 5 g di peperoni essiccati a 40 °C sono stati sottoposti ad estrazione in dinamico per 60 minuti con flusso di CO<sub>2</sub> di 0,5 litri in un impianto scala banco a differenti condizioni supercritiche di pressione (250, 350 e 450 bar) e di temperatura (40, 50 e 60 °C).

Dai risultati ottenuti è possibile dedurre che la pressione ha avuto un effetto significativo sul contenuto totale di carotenoidi nell'estratto. Allo stesso tempo, nessun effetto statisticamente significativo della temperatura era osservato sulla resa di estrazione e sul contenuto di carotenoidi totali. Questa osservazione è in accordo con quanto già riportato da Kostrzewa et al. 2022 i quali indicavano che le migliori performance estrattive erano ottenute con pressione di 450 bar e temperatura di 50 °C. Anche Fornereto Soldan et al. 2021 riscontravano che temperatura, pressione e interazione tra queste due variabili influivano in modo significativo nella resa di carotenoidi mediante estrazioni con la tecnica estrattiva con fluidi supercritici. Inoltre, Uquiche et al. 2012 riportavano che la solubilità del  $\beta$ -carotene e del licopene nella CO<sub>2</sub> supercritica aumenta con la pressione.

Per quanto riguarda i profili dei carotenoidi determinati mediante metodica cromatografica per gli estratti ottenuti con le differenti condizioni operative non sono state osservate significative differenze. In tutti gli estratti, in accordo con i valori recentemente riportati nel lavoro di Kostrzewa et al. 2023, è stato determinato come carotenoide principale la capsantina che rappresentava circa il 35% dei totali.

La capsorubina, la luteina, la capsantina e la zeaxantina vengono eluite nei primi 7,3 minuti, successivamente viene eluita la  $\beta$ -criptoxantina a 12,8 minuti ed infine il  $\beta$ -carotene a 18,2 minuti. Quest'ordine di eluizione, come si evidenzia dalla figura 20, è dovuto alla differente struttura molecolare.



**Figura 20. Struttura molecolare 3D dei principali carotenoidi rilevati negli estratti di peperone di Senise: 1) capsorubina, 2) luteina, 3) capsantina, 4) zeaxantina, 5)  $\beta$ -criptoxantina, 6)  $\beta$ -carotene. Immagini generate tramite PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>).**

I carotenoidi che hanno un maggior numero di ossidrili sono meno trattenuti nella colonna Zorbax RX-C18. Questo dato è in accordo con quanto riportato nello studio di Turcsi et al. 2016 secondo cui, su una colonna a fase di silice legata all'ottadecile (C18), i carotenoidi vengono eluiti nell'ordine della loro polarità.

## 6 Conclusioni

Considerata la crescente richiesta di un prodotto di nicchia come il peperone di Senise innovare il processo di essiccazione potrebbe rappresentare una vera esigenza per il comparto produttivo.

In tal senso, il presente studio fornisce dei dati interessanti e suggerisce i parametri operativi da adottare mediante tecniche non tradizionali per l'essiccazione del peperone che permettono di ridurre il tempo di processo scongiurando la possibile proliferazione di microorganismi.

Dai risultati emerge che, accelerando il processo di essiccazione, il contenuto di importanti componenti bioattivi come i carotenoidi ed i fenoli totali non si riduce. Addirittura, il livello di acido ascorbico nel prodotto è superiore rispetto a quello determinato su prodotti essiccati in maniera tradizionale.

Inoltre, il prodotto di scarto della filiera di produzione può essere considerato una fonte interessante di carotenoidi che possono essere recuperati mediante un processo di bioraffineria utilizzando CO<sub>2</sub> supercritica come solvente. In questo modo, nell'ottica di bioeconomia circolare, una materia prima a basso costo viene trasformata in un prodotto con un valore aggiunto come può essere un estratto, senza residui di solventi nocivi, ricco in capsantina e altri carotenoidi naturali.

In conclusione, questi risultati contribuiscono ad innovare una filiera produttiva e rappresentano una base di partenza anche per lo sviluppo di nuovi prodotti potenzialmente utilizzabili in ambito nutraceutico e farmaceutico.

## Bibliografia

- Anaya-Esparza, L.M., de la Mora, Z.V., Vázquez-Paulino, O., Ascencio, F., Villarruel-López, A., 2021. Bell peppers (*Capsicum annum* L.) losses and wastes: Source for food and pharmaceutical applications. *Molecules* 26, 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules26175341>
- Arcella, D., Eskola, M., Gómez Ruiz, J.A., 2016. Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA J* 14. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4654>
- Asam, S., Rychlik, M., 2013. Potential health hazards due to the occurrence of the mycotoxin tenuazonic acid in infant food. *Eur Food Res Technol* 236. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1901-x>
- Basheer, L., Ben-Simchon, E., Cohen, A., Shelef, O., 2021. From traditional food to functional food? Evaluation of malvaceae species as novel food crops. *Agronomy* 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071294>
- Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N., 2006. *Transport Phenomena, Transport Phenomena*. Wiley.
- Boulter, L., 2017. Moreish crunch smoky tang red peppers of Italy's far south.pdf. *Guard* Retrieved.
- Crudo, Varga, Aichinger, Galaverna, Marko, Dall'Asta, Dellafiora, 2019. Co-Occurrence and Combinatory Effects of *Alternaria* Mycotoxins and other Xenobiotics of Food Origin: Current Scenario and Future Perspectives. *Toxins (Basel)* 11, 640. <https://doi.org/10.3390/toxins11110640>
- Davies, H.C., 1976. A lateral boundary formulation for multi-level prediction models. *Q J R Meteorol Soc* 102, 405–418. <https://doi.org/10.1002/qj.49710243210>
- de Aguiar, A.C., Sales, L.P., Coutinho, J.P., Barbero, G.F., Godoy, H.T., Martínez, J., 2013. Supercritical carbon dioxide extraction of *Capsicum* peppers: Global yield and capsaicinoid content. *J Supercrit Fluids* 81, 210–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.05.008>
- Di Sanzo, G., Mehariya, S., Martino, M., Larocca, V., Casella, P., Chianese, S., Musmarra, D., Balducci, R., Molino, A., 2018. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin, lutein, and fatty acids from *haematococcus pluvialis* microalgae. *Mar Drugs* 16. <https://doi.org/10.3390/md16090334>
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., Manyes, L., 2017. *Alternaria* Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. *J Food Qual* 2017, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2017/1569748>
- Fanelli, E., 2021. Peperone di Senise IGP , la Regione rilancia il padre del " crusco " 1–6.
- Fornereio Soldan, A.C., Arvelos, S., Watanabe, É.O., Hori, C.E., 2021. Supercritical fluid extraction of oleoresin from *Capsicum annum* industrial waste. *J Clean Prod* 297. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126593>
- Gnayfeed, M.H., Daood, H., Biacs, P.A., Alcaraz, C.F., 2001. Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. *J Sci Food Agric* 81, 1580–1585. <https://doi.org/10.1002/jsfa.982>
- Green, D.W., Perry, R.H., 2007. *Perry's Chemical Engineers' Handbook, Eighth Edition*, McGraw Hill professional. McGraw Hill LLC.

- Guiné, R.P.F., 2008. Pear drying: Experimental validation of a mathematical prediction model. *Food Bioprod Process* 86, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2007.11.001>
- Guiné, R.P.F., Fernandes, R.M.C., 2006. Analysis of the drying kinetics of chestnuts. *J Food Eng* 76, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.04.063>
- HOWARD, L.R., SMITH, R.T., WAGNER, A.B., VILLALON, B., BURNS, E.E., 1994. Provitamin A and Ascorbic Acid Content of Fresh Pepper Cultivars (*Capsicum annuum*) and Processed Jalapeños. *J Food Sci* 59, 362–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06967.x>
- Jiménez, D., Vardanega, R., Salinas, F., Espinosa-Álvarez, C., Bugueño-Muñoz, W., Palma, J., Meireles, M.A.A., Ruíz-Domínguez, M.C., Cerezal-Mezquita, P., 2021. Effect of drying methods on biorefinery process to obtain capsanthin and phenolic compounds from *Capsicum annuum* L. *J Supercrit Fluids* 174, 105241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105241>
- Kim, J.-S., Ha, T.-Y., Kim, S., Lee, S.-J., Ahn, J., 2017. Red paprika (*Capsicum annuum* L.) and its main carotenoid capsanthin ameliorate impaired lipid metabolism in the liver and adipose tissue of high-fat diet-induced obese mice. *J Funct Foods* 31, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.044>
- Kostrzewska, D., Dobrzyńska-Inger, A., Mazurek, B., Kostrzewska, M., 2022. Pilot-Scale Optimization of Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Dry Paprika *Capsicum annuum*: Influence of Operational Conditions and Storage on Extract Composition. *Molecules* 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27072090>
- Kostrzewska, D., Mazurek, B., Kostrzewska, M., Jóźwik, E., 2023. Carotenoids and Fatty Acids Obtained from Paprika *Capsicum annuum* by Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol as Co-Extractant. *Molecules* 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28145438>
- Krinsky, N.I., Johnson, E.J., 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 26, 459–516. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
- Larocca, V., Martino, M., Trupo, M., Magarelli, R.A., Spagnoletta, A., Ambrico, A., 2023. Evaluation of carbon dioxide supercritical fluid extraction (CO<sub>2</sub>-SFE) on carotenoids recovery from red yeast cells. *Biomass Convers Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04434-z>
- Lewicki, P., 2006. Design of hot air drying for better foods. *Trends Food Sci Technol* 17, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.012>
- Maoka, T., 2009. Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Arch Biochem Biophys* 483, 191–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.019>
- Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., 2004. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* 52, 3861–3869. <https://doi.org/10.1021/jf0497915>
- MarketsandMarkets, 2020. Carotenoid Market 2021.
- Matei, N., Dobrinas, S., Radu, G.L., 2012. Spectrophotometric determination of ascorbic acid in grapes with the Prussian Blue reaction. *Analele Univ "Ovidius" Constanta - Ser Chim* 23, 174–179. <https://doi.org/10.2478/v10310-012-0029-y>
- Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M., Takeda, M., 1998. Antioxidant Activity of Capsanthin

and the Fatty Acid Esters in Paprika (*Capsicum annum*). *J Agric Food Chem* 46, 3468–3472. <https://doi.org/10.1021/jf980200i>

Mipaaf, 2020. Modifica del disciplinare di produzione della denominazione «Peperoni di Senise» registrata in qualità di indicazione geografica protetta in forza al regolamento (CE) n. 1263 del 1° luglio 1996. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea - Serie L* 386 del 18 novembre 2020.

Mujumdar, A.S., 2006. *Handbook of Industrial Drying*. CRC Press.

Panel, E., Chain, F., 2011. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J* 9, 1–97. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>

Scopa, A., Posca, G., Bufo, S.A., Scrano, L., 2006. COMPARATIVE HPLC DETERMINATION OF ASCORBIC AND DEHYDROASCORBIC ACIDS IN “PEPERONI DI SENISE”, A GEOGRAPHICALLY EUROLABELLED SWEET PEPPER 28, 39–45.

Shah, N.A., Prasad, R. V., Patel, B.B., 2020. Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Paprika (cv. Reshampatti) Oil, Capsaicin and Pigments. *Flavour Fragr J* 35, 469–477. <https://doi.org/10.1002/ffj.3579>

Silva, M.M., Reboredo, F.H., Lidon, F.C., 2022. Food Colour Additives: A Synoptical Overview on Their Chemical Properties, Applications in Food Products and Health Side Effects. *Foods* 11. <https://doi.org/10.3390/foods11030379>

Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16, 144–58.

Siniscalli, C., Faraone, I., Vassallo, A., Caddeo, C., Bisaccia, F., Armentano, M.F., Milella, L., Ostuni, A., 2020. Phytochemical profile of *capsicum annum* L. Cv senise, incorporation into liposomes, and evaluation of cellular antioxidant activity. *Antioxidants* 9. <https://doi.org/10.3390/antiox9050428>

Speranza, G., Lo Scalzo, R., Morelli, C.F., Rabuffetti, M., Bianchi, G., 2019. Influence of drying techniques and growing location on the chemical composition of sweet pepper (*Capsicum annum* L., var. Senise). *J Food Biochem* 43, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13031>

Stahl, W., Sies, H., 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1740, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.006>

Toontom, N., Meenune, M., Posri, W., Lertsiri, S., 2012. Effect of drying method on physical and chemical quality, hotness and volatile flavour characteristics of dried chilli. *Int Food Res J* 19, 1023–1031.

Tralamazza, S.M., Piacentini, K.C., Iwase, C.H.T., de Oliveira Rocha, L., 2018. Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Curr Opin Food Sci* 23, 57–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.002>

Turcsi, E., Nagy, V., Deli, J., 2016. Study on the elution order of carotenoids on endcapped C18 and C30 reverse silica stationary phases. A review of the database. *J Food Compos Anal* 47, 101–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.01.005>

Uquiche, E., Romero, V., Ortíz, J., Del Valle, J.M., 2012. Extraction of oil and minor lipids from cold-press rapeseed cake with Supercritical CO<sub>2</sub>. *Brazilian J Chem Eng* 29, 585–



597. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000300016>

Vafaei, N., Rempel, C.B., Scanlon, M.G., Jones, P.J.H., Eskin, M.N.A., 2022. Application of Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Tocopherols and Carotenoids (Hydrophobic Antioxidants) Compared to Non-SFE Methods. *AppliedChem* 2, 68–92. <https://doi.org/10.3390/appliedchem2020005>

Vega-Gálvez, A., Lemus-Mondaca, R., Bilbao-Sáinz, C., Fito, P., Andrés, A., 2008. Effect of air drying temperature on the quality of rehydrated dried red bell pepper (var. Lamuyo). *J Food Eng* 85, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.06.032>

ENEA  
Servizio Promozione e Comunicazione  
[www.enea.it](http://www.enea.it)

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati  
dicembre 2023